

A *Neosartorya fischeri* antifungális protein biológiai szerepének vizsgálata

TÓTH LILIÁNA¹ – KOVÁCS LAURA¹ – VÁGVÖLGYI CSABA¹ –
FLORENTINE MARX² – GALGÓCZY LÁSZLÓ¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Mikrobiológiai Tanszék

²Innsbrucki Orvosi Egyetem, Biocenter, Molekuláris Biológia Osztály

Bevezetés

Az 1970-es évek óta folyamatosan növekszik a mikrobiális fertőzések esetszáma, ami komoly gondot jelent mind az egészségügy, mind a mezőgazdaság számára. A problémát tovább súlyosbítja a legyengült immunrendszerű betegek növekvő száma (pl. AIDS, rosszul kezelt diabetes mellitus, szervátültetés), az immunszuppresszív terápia elterjedése, az antibiotikumokra rezisztens mikroorganizmusok számának növekedése és a széles spektrumú antibiotikumok nem megfelelő használata. Különösen nagymértékű növekedés következett be az opportunista gombafertőzések esetszámában, amikor a legyengült szervezetben, egy egészséges emberrel szemben nem patogén gomba kórokozóként tűnik fel.

A növényvédelemnek is komoly gondot jelent a fonalasgombák által okozott, a világszerte hatalmas mezőgazdasági termés kiesés nagy részéért felelős fertőzések leküzdése. Az ennek érdekében tett erőfeszítések célja a hatékony antimikrobiális szerek alkalmazásával történő termésátlag megtartása, illetve annak növelése. Az ilyen szerekkel szemben támasztott legfontosabb követelmény, hogy ne károsítsa a környezetet; ne okozzon egészségügyi problémákat emberben, állatokban és növényekben. Fontos szempont továbbá, hogy minél olcsóbban és nagyobb mennyiségben lehessen előállítani.

Mindezekből következően szükség van új, hatékony antifungális szerek kifejlesztésére. Az eddigi vizsgálatok alapján, a fonalasgombák által termelt defenzinszerű antimikrobiális proteinek számos tulajdonsága megfelel az újonnan kifejlesztendő, a gyógyászatban és a növényvédelemben használatos szerekkel szemben támasztott legfontosabb követelményeknek, így a már korábban vizsgált, a *Neosartorya fischeri* NRRL 181 által termelt *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) is.

Irodalmi áttekintés

Az ascomycota fonalasgombák által termelt defenzinszerű antifungális proteinek jellemzése

Több évtizede ismert, hogy számos növényi- és állati szervezet képes olyan gének által kódolt antimikrobiális peptideket termelni, amelyek hatékony

védelmet biztosítanak számukra egyes mikroorganizmusokkal szemben. Antimikrobiális peptideket a ma ismert élőlények szinte minden csoportja termel. Termelhetik például baktériumok, protozoonok, növények, ízeltlábúak és gerincesek is. Az 1990-es évek második felétől a defenzinek szerkezetéhez nagymértékben hasonló, antifungális hatással rendelkező fehérjéket izoláltak a tömlősgombák törzsébe tartozó fonalas gombafajokból: *Aspergillus clavatus* antifungális protein (ACLA), *Aspergillus giganteus* (MDH 18894) antifungális protein (AFP), *Aspergillus giganteus* (A3274) antifungális protein (AFPNN5353), *Aspergillus niger* antifungális protein (ANAFP), *Fusarium polyphialidicum* antifungális protein (FPAP), *Penicillium nalgiovense* antifungális protein (NAF), *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP), *Penicillium chrysogenum* (Q176) antifungális protein (PAF) és *Penicillium chrysogenum* (RP42C) antifungális protein (PgAFP).¹ Az eddig ismertté vált Ascomycoták által termelt antifungális proteineket és azok tulajdonságait az (1. táblázat) foglalja össze. Ezek az extracelluláris fehérjék hasonló szerkezetük ellenére, eltérő hatásmechanizmussal és fajspecifitással rendelkeznek. A legfontosabb közös tulajdonságaik: az alacsony molekulatömeg (5,8–6,6 kDa), a bázikus karakter és a 6–8 cisztein molekula által képzett intramolekuláris diszulfid-hidak jelenléte, amelyek nagymértékű stabilitást biztosítanak számukra proteáz degradációval és magas hőmérséklettel szemben, továbbá széles pH tartományon belül.² A fehérjék bázikus jellegét a nagy mennyiségben jelenlévő arginin és lizin származékok okozzák. Elsődleges szerkezetükben a felsorolt jellemzők ellenére viszonylag kismértékű hasonlóságot mutatnak. Az aminosav szekvenciák között csak 31,6–91,4%-os a hasonlóság, kivéve a PAF-t és a NAF-t, amelyek teljesen azonosak.³ Az ACLA, az AFP, az ANAFP és a PAF érett formái aminosav szekvenciájukban különbözöek, azonban nagyon hasonló harmadlagos fehérjeszerkezettel rendelkeznek.⁴ Aminosav szekvenciájukban minden esetben konzervált homológ régiók figyelhetők meg.⁵ Ilyen a cisztein molekulák elhelyezkedése és az azokat határoló aminosavak kisebb-nagyobb mértékű egyezése (1. kép).⁶ A fehérjék *in silico* előre jelzett harmadlagos szerkezete nagyon hasonlít a defenzinek szerkezetéhez, három hurokkal összekapcsolt öt antiparallel β -redőt tartalmaz, ami egy β -hordót alakít ki.⁷

¹ BINDER ET AL. 2011, 209; GALGÓCZY ET AL. 2013b, 131–137; GEISEN 2000, 95–101; KOVÁCS ET AL. 2011b, 1724–1731; LEE ET AL. 1999, 646–651; MARX ET AL. 1995, 167–171; RODRÍGUEZ-MARTÍN ET AL. 2010, 541–547; SKOURI-GARGOURI – GARGOURI 2008, 1871–1877; WNENDT – ULBRICH – STAHL 1994, 519–523.

² MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

³ MARX 2004, 133–142.

⁴ MARX 2004, 133–142; BATTÁ ET AL. 2009, 2875–2890; MEYER 2008, 17–28.

⁵ GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559.

⁶ MARX ET AL. 1995, 167–171; MARX 2004, 133–142.

⁷ BATTÁ ET AL. 2009, 2875–2890; MEYER 2008, 17–28.

Fehérje	Gombafaj	Aminosavszám	Molekula- tömeg (kDa)	Cys szám
ACLA	<i>Aspergillus clavatus</i> VR1	51	5.8	8
AFP	<i>Aspergillus giganteus</i> MDH 18894	51	5.8	8
AFP_{NN5353}	<i>Aspergillus giganteus</i> A3274	51	5.7	8
ANAFP	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 2025	58	6.6	6
FPAP	<i>Fusarium polyphialidicum</i> SZMC 11042 11042	55	6.4	6
NAF	<i>Penicillium nalgiovense</i> BFE 66, 67, 474	55	6.3	6
NFAP	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	57	6.6	6
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176	55	6.3	6
PgAFP	<i>Penicillium chrysogenum</i> RP42C	58	6.5	6

1. táblázat: A *Penicillium chrysogenum* antifungális protein (PAF) és az ascomycota fonalas gombákból izolált homológjai

A proteinek rövidítése: ACLA, *Aspergillus clavatus* antifungális protein; AFP, *Aspergillus giganteus* antifungális protein; ANAFP, *Aspergillus niger* antifungális protein; FPAP, *Fusarium polyphialidicum* antifungális protein; NAF, *Penicillium nalgiovense* antifungális protein; NFAP, *Neosartorya fischeri* antifungális protein; PAF, *Penicillium chrysogenum* antifungális protein. A törzsgyűjtemények rövidítése: **BFE**, Federal Research Centre for Nutrition, Karlsruhe, Germany; **MDH**, Michigan Department of Health, USA; **KCTC**, Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, South Korea; **NRRL**, Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA; **SZMC**, Szeged Microbial Collection, University of Szeged, Szeged, Hungary.

Ezt a szerkezeti tulajdonságot az AFP és a PAF esetében kísérletesen is megerősítették.⁸ A PAF és az AFP a legintenzívebben tanulmányozott fonalasomba eredetű defenzinszerű antifungális fehérje. Antimikrobiális hatásukat az egy- illetve kétértékű kationok jelenléte erősen csökkenti.⁹ Bebizonyították, hogy génjeik 5'-upstream régiói, olyan transzkripció faktorok kötőhelyeit tartalmazzák, amelyek részt vesznek a környezeti stresszválaszra beinduló génexpresszióban.¹⁰ A szakirodalomban kevés információ áll

⁸ BATTÁ ET AL. 2009, 2875–2890; CAMPOS-OLIVAS ET AL. 1995, 3009–3021; LACADENA ET AL. 1995, 273–281.

⁹ MARTINEZ-RUIZ ET AL. 1997, 81–87; MARX 2004, 133–142.

¹⁰ MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

rendelkezésükre a fehérjék szerkezete és antifungális hatása közötti kapcsolat megértéséhez. A meglévő adatok elsősorban a PAF-ra korlátozódnak. Megállapították, hogy az optimális antifungális hatás eléréséhez, szükséges a fehérjék megfelelő térszerkezetének kialakulása, a diszulfid-hidak jelenléte, továbbá a gombaellenes hatás kifejtéséért a molekula erősen konzervált, pozitív töltésű, lizingazdag felületi régiója a felelős.¹¹

		10		20		30		40		50																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
ACLA	-	A	T	Y	D	G	K	C	Y	K	K	D	N	I	C	K	Y	K	A	Q	S	G	K	T	A	I	C	K	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. kép: A *Penicillium chrysogenum* antifungális protein és ascomycota fonalas gombákból izolált homológjai

Rövidítések: ACLA, *Aspergillus clavatus* VR1 antifungális protein (acc.no.: ABR10398) (SKOURI-GARGOURI – GARGOURI 2008); AFP, *Aspergillus giganteus* MDH 18894 antifungális protein (acc.no.: X60771) (WNENDT – UNBRICH – STAHL 1994); AFPNN5353 *Aspergillus giganteus* A3274 antifungális protein (BINDER ET AL. 2011); ANAFP, *Aspergillus niger* KCTC 2025 antifungális protein (LEE ET AL. 1999); FPAP, *Fusarium polyphialidicum* SZMC 11042 antifungális protein (acc.no.: CAR79015) (KOVÁCS ET AL. 2011); NFAP, *Neosartorya fischeri* NRRL 181 antifungális protein (acc.no.: CAQ42994) (GALGÓCZY ET AL. 2013); PAF, *Penicillium chrysogenum* Q176 antifungális protein (acc.no.: AAA92718) (MARX ET AL. 2008); PgAFP, *Penicillium chrysogenum* RP42C antifungális protein (acc.no.: ACX54052); NAF, *Penicillium nalgiovense* BFE 66, 67, 474 antifungális protein (GEISEN 2000).

A defenzinszerű antifungális fehérjék hatásmechanizmusa

A fonalas Ascomycoták által szekretált defenzinszerű antifungális proteinek eltérő gombaellenes spektrummal rendelkeznek,¹² azonban harmadlagos szerkezetük nagyon hasonló és a fonalas gombákban hasonló tüneteket váltanak ki.¹³ Gátolják a hifák növekedését, a spórák csírázását és többszörösen elágazó hifanövekedést idéznek elő.¹⁴ A növekedésgátlás koncentrációfüggő és elsősorban más fonalas gombákkal szemben érvényesül.¹⁵ Annak ellenére, hogy a felsorolt tünetek megegyeznek, a két legalaposabban tanulmányozott protein (a PAF és az AFP) esetében kiderült, hogy azok hatásmechanizmusa

¹¹ MARX ET AL. 2005, 35–46.

¹² GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559; MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

¹³ BATTÁ ET AL. 2009, 2875–2890; CAMPOS-OLIVAS ET AL. 1995, 3009–3021; LACADENA ET AL. 1995, 273–281.

¹⁴ KOVÁCS ET AL. 2011b, 1724–1731; MARX ET AL. 2008, 445–454; MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

¹⁵ MARX 2004, 133–142.

különbözik. A PAF receptormediált endocitózissal jut be az érzékeny gombák sejtjeibe és ott egy G-protein kapcsolt jelátviteli úton keresztül intracellulárisan fejti ki hatásait: intracelluláris oxidatív stresszt, metabolikus inaktivitást, reaktív oxigén gyök (ROS) felhalmozódást és plazmamembrán hiperpolarizációt idéz elő.¹⁶

A cAMP/protein kináz A szignalizációs kaszkád aktiválásával apoptózist indukál és a protein kináz C/mitogén aktivált protein kináz szignalizációs útvonal gátlása révén gátolja a sejtfa szintézisét.¹⁷ Ezzel szemben az AFP nagyobb része a sejtfa külső rétegében, a sejtfaiban és a plazmamembránban halmozódik fel, ahol a sejtfa integritásának a megszűnését és plazmamembrán permeabilizációt idéz elő, és a kitin-szintázok specifikus gátlása révén megakadályozza a sejtfa kiépülését. Kisebb hányada pedig közvetlenül elektrosztatikusan köt a rá érzékeny mikroorganizmus membránjához és azon pórusokat képez.¹⁸

Bebizonyították, hogy ezek a fehérjék hatással vannak az érzékeny mikroorganizmusok Ca^{2+} háztartására, ugyanis az *A. giganteus* A3274-ből izolált AFPNN5353 és a PAF az *A. niger*-ben és a *Neurospora crassa*-ban felborítja a Ca^{2+} -homeosztázist, illetve a citoszólikus Ca^{2+} szabad nyugalmi szintjét is jelentősen megemeli.¹⁹ A defenzinszerű antifungális fehérjék a termelő gomba aszexuális differenciálódásában is fontos szerepet játszanak, illetve szerepük lehet az élőhelyért és a tápanyagokért folytatott versenyben a hasonló ökológiai *niche*-t elfoglaló gombafajokkal szemben.²⁰

A fonalas Ascomycota fajok által szekretált defenzinszerű antifungális fehérjék, számos tulajdonságuk alapján, az orvosi és a mezőgazdasági területeken alkalmazható hatékony gombaellenes szerek alapjául szolgálhatnak.²¹ Hatékony antifungális hatást fejtenek ki a potenciális humán- és növénypatogén gombafajokkal szemben.²² Nem okoznak toxikus hatást növényi sejteken *in vitro* és *in vivo*, így alkalmazhatók a mezőgazdaságban, illetve nem károsítják az emlős sejteket, nem váltanak ki gyulladáskeltő reakciót *in vitro* és a PAF, antifungális hatását megtartva, ártalmatlannak

¹⁶ BINDER ET AL. 2010a, 1374–1382; GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559; KAISERER ET AL. 2003, 204–210; LEITER ET AL. 2005, 2445–2453; OBERPARLEITER ET AL. 2003, 3598–3601.

¹⁷ BINDER ET AL. 2010b, 294–307.; GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559; LEITER ET AL. 2005, 2445–2453.

¹⁸ BINDER ET AL. 2011, 209; HAGEN ET AL. 2007, 2128–2134; LACADENA ET AL. 1995, 273–281; THEIS ET AL. 2003, 588–593; THEIS ET AL. 2005, 47–56.

¹⁹ BINDER ET AL. 2011, 209; BINDER ET AL. 2010a, 1374–1382.

²⁰ GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559; HEGEDŰS ET AL. 2011, 253–262.

²¹ GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559.

²² GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559; MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

bizonyul az emlős szervezeten belül.²³ Képesek szinergista kölcsönhatásba lépni más antimikrobiális peptidekkel, antifungális és antifungális aktivitással rendelkező, nem-antifungális szerekkel. Nagymértékű stabilitást mutatnak a proteáz degradációval, a magas hőmérséklettel és a széles pH tartománnyal szemben,²⁴ továbbá gazdaságosan megtermeltethetők.²⁵ Azonban a felsorolt ígéretes tulajdonságok ellenére a fehérjék gyakorlati alkalmazása továbbra is korlátozott.

Ennek fő okai: az alacsony hozamú termelés,²⁶ az egy- és kétértékű kationok jelenléte okozta gombaellenes hatás csökkenés,²⁷ a szűk antifungális spektrum és az, hogy a mai napig nem ismert a fehérjeszerkezet és antifungális hatás közötti kapcsolat.²⁸

***Neosartorya fischeri* antifungális fehérje**

Az *N. fischeri* antifungális protein (NFAP) az *N. fischeri* (anamorfja: *A. fischerianus*) izolátumból kimutatott 6,6 kDa tömegű, antifungális aktivitással rendelkező, defenzinszerű fehérje. Ötvenhét aminosavból álló bázikus, ciszteinben gazdag protein. 37,9–50%-os homológiát mutat az ACLA, az AFP, az ANAFP és a PAF aminosav szekvenciájával.²⁹ Az NFAP molekula lehetséges térbeli szerkezetét *in silico* készítettük el, felépítésének részletes megismerése érdekében (a Ramachandran plot: 90,02%-ra értékelték PROCHECK segítségével) (2. kép).³⁰ A előre jelzett szerkezet alapján az NFAP becsült tömege 6625,5 Da és az izoelektromos pontja 8,93 (3.A kép).³¹ A molekula nettó töltése +5,0 (pH=7.0) (PROTEIN CALCULATOR v3.3, The Scripps Kutatóintézet³²). Ez az *in silico* előre jelzett struktúra nagymértékű hasonlóságot mutat a defenzinszerű molekulák szerkezetével: hurkokkal összekapcsolt öt antiparalel β -redőből (L1-G5, N12-I18, K21-C27, K41-S46 és K50-D54) épül fel, amelyet három intracelluláris diszulfid híd stabilizál (C7-C35, C14-C42 és C27-C53) (3.B kép).³³ Az NFAP tartalmaz: egy N-terminális β -redőt (L1-G5), egy nagy, a C27 és C35 között elhelyezkedő hurkot és egy, az

²³ GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559; MARX ET AL. 2008, 445–454; MEYER 2008, 17–28; PALICZ ET AL. 2013, 8–16.

²⁴ GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559.

²⁵ MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

²⁶ GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559; MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

²⁷ MARX 2004, 133–142.

²⁸ GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010, 550–559; MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

²⁹ KOVÁCS ET AL. 2011b, 1724–1731.

³⁰ LASKOWSKI ET AL. 1993, 283–291; LASKOWSKI ET AL. 1996, 477–486.

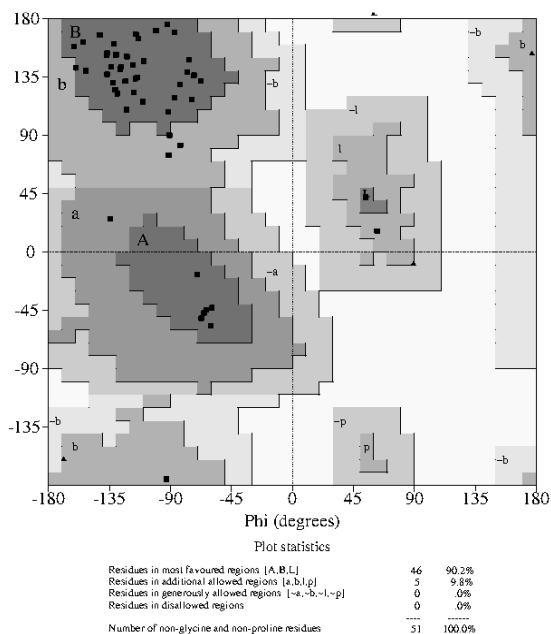
³¹ ARTIMO ET AL. 2012, 597–603.

³² PROTEIN CALCULATOR v3.3, The Scripps Kutatóintézet.

Forrás: <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html> (2014.04.13. 17:18).

³³ CERONI ET AL. 2006, 177–181; CHENG ET AL. 2005, 72–76; SALI ET AL. 1995, 318–326.

utolsó β -redőt (K50-D54) követő, három aminosavból álló rövid farkat (F55-H57) (3.A kép). Az AFP-hez és a PAF-hoz hasonlóan, az NFAP is amfipatikus felülettel és egy központi, rejtett, hidrofób maggal rendelkezik (Y3, I18, Y16, Y23, Y44) (3.C és D kép).³⁴



2. kép: Ramachandran plot (90.02%) Az NFAP in silico előre jelzett struktúrájának PROCHECK segítségével történő értékelése (LASKOWSKI ET AL. 1993; LASKOWSKI ET AL. 1996)

Az NFAP antifungális hatásainak érzékeny gombafajokon megfigyelhető megnyilvánulásai a többi antifungális fehérje esetén megfigyelt tünetekkel nagymértékű egyezést mutatnak. Az NFAP csírázás során kiváltott tünetei az AFP és PAF esetében leírtakhoz hasonló, jellemző a duzzadt, rövid, görbült hifa és a töredezett citoplazma,³⁵ továbbá jellemző, hogy ez a három protein különböző, szűk antifungális spektrumuk ellenére, hasonló fajspecifitással rendelkeznek.³⁶

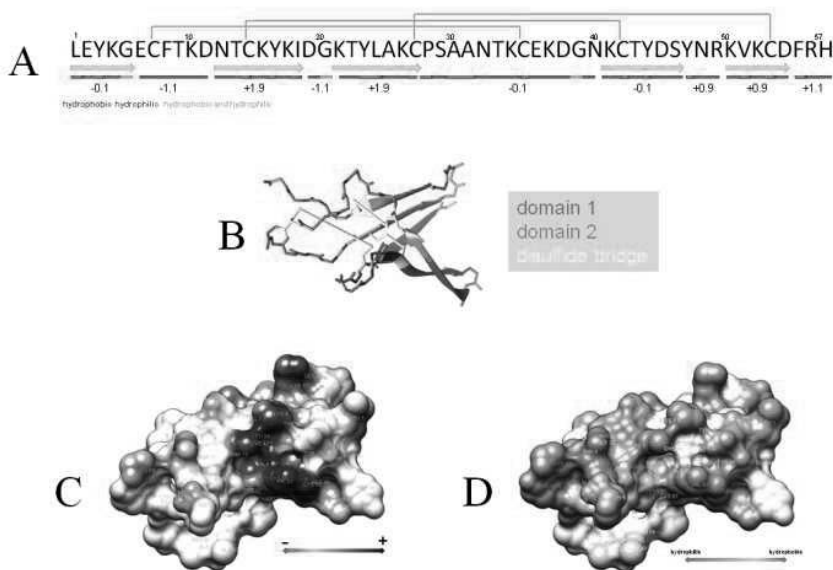
Szerkezete következtében nagymértékű stabilitást mutat extrém pH és hőmérsékleti értékekkel, illetve proteolízissal szemben.³⁷ A tünetei mögötti pontos hatásmechanizmus, valamint a fehérje szerkezete és antifungális hatása közötti kapcsolat a mai napig nem tisztázott.

³⁴ PETTERSEN ET AL. 2004, 1605–1612.

³⁵ MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

³⁶ KOVÁCS ET AL. 2011a, 327; KOVÁCS ET AL. 2011b, 1724–1731; MARX 2004, 133–142; MEYER 2008, 17–28.

³⁷ BATTÁ ET AL. 2009, 2875–2890; VILA ET AL. 2001, 1327–1331.



3. kép A: *Neosartorya fischeri* antifungális protein (NFAP) elsődleges aminosav szekvenciája (ARTIMO ET AL. 2012; CERONI ET AL. 2006; CHENG ET AL. 2005; SALI ET AL. 1995). **B:** MODELLER 9.9 segítségével elkészített és a UCSF Chimera szoftver segítségével megjelenített érett NFAP hipotetikus 3D modellje (PETTERSEN ET AL. 2004; SALI ET AL. 1995). A feltételezett diszulfidhidak sárgával vannak jelölve. **C–D:** UCSF Chimera szoftver elemzése alapján az NFAP előre jelzett elektrosztatikus (C) és hidrofób (D) felülete (PETTERSEN ET AL. 2004).

Az AFP-t és PAF-ot kódoló gének upstream régiójához hasonlóan, az *nfap* gép upstream régiójában is számos, a környezeti stresszválasz szabályozásában szerepet játszó elem van jelen.³⁸ Az NFAP hatékonyan gátolja számos fonalagomba növekedését, beleértve a potenciális növény és humán patogéneket is.³⁹ Más antifungális fehérjéhez hasonlóan, ez a növekedésgátló hatás dóziszfüggő tulajdonságot mutat az érzékeny gombafajokkal szemben, továbbá nagymértékben függ az extracellulárisan jelenlévő egy- és kétértékű kationoktól.⁴⁰

³⁸ MARX 2004, 133–142.

³⁹ KOVÁCS ET AL. 2011a, 327; KOVÁCS ET AL. 2011b, 1724–1731.

⁴⁰ GALGÓCZY ET AL. 2013a, 411–419, KOVÁCS ET AL. 2011a, 327; MARX 2004, 133–142.

Célkitűzések

Előzetes munkánk során izoláltunk és jellemeztünk a *Neosartorya fischeri* NRRL181-ből egy antifungális fehérjét (*N. fischeri* antifungális protein, NFAP).⁴¹ Kimutattuk, hogy az NFAP számos orvosi és mezőgazdasági szempontból káros fonalgombba növekedését gátolja.⁴² Előállítottunk egy a proteinre szenzitív, az NFAP-t heterológ módon megtermelni képes *Aspergillus nidulans* gombatörzset.

A szakirodalomban nem található magyarázat a fonalgombák által termelt defenzinszerű antimikrobiális proteinek biológiai szerepére. Ilyen típusú proteineket mindeztáig kizárólag mezőgazdasági és orvosi szempontból jelentős fajokban sikerült kimutatni. Feltételezéseink szerint fontos szerepet játszhatnak a tápanyagok megszerzéséért és a megfelelő élőhelyért folytatott versenyben más, hasonló ökológiai *niche*-t elfoglaló mikroorganizmusokkal szemben.

Mindezek alapján a munkánk során célul tűztük ki:

1. A *N. fischeri* NRRL 181 NFAP-t kódoló génben deléciós mutánsának előállítását.
2. Vad típusú és deléciós mutáns *N. fischeri* törzsek növekedésének vizsgálatát eltérő táptalajtípusokon (CM (komplett táptalaj) és MM (minimál táptalaj)).
3. Vad típusú és deléciós mutáns *N. fischeri* törzsek *in vitro* antagonizmusának vizsgálatát különböző nemzetségbe tartozó járomspórás- és tömlősgomba izolátumokkal szemben, eltérő táptalajtípusokon (CM és MM).

Eredmények és megvitatásuk

A Δnfap mutáns Neosartorya fischeri előállítása

A szintetizált lineáris deléciós konstrukcióval elvégeztük a *Neosartorya fischeri* NRRL 181 izolátum transzformációját. A PEG(polietilén glikol)-mediált transzformáció 5 µg DNS és 1×10⁶ protoplaszt alkalmazásával történt. A transzformáns telepek a transzformációt követően 2–3 nap után jelentek meg. A kísérletek során nyert transzformánsok szelekcióját pyritiamin antibiotikum rezisztencia markergén alapján végeztük, melyek genotípusát a genomi DNS *EcoRV*-el történő emésztése után *Southern blot* analízissel ellenőriztük.

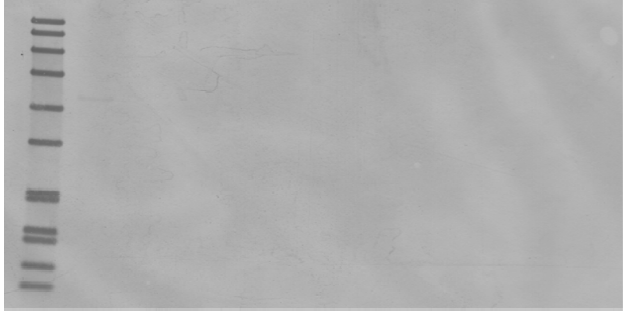
Sikeresen deletáltuk az *nfap* gént *Neosartorya fischeri* NRRL 181 izolátumból. A *Southern blot* analízis kimutatta, hogy a transzformánsokban a

⁴¹ KOVÁCS ET AL. 2011b, 1724–1731.

⁴² KOVÁCS ET AL. 2011a, 327; KOVÁCS ET AL. 2011b, 1724–1731.

bevitt konstrukció az *nfap* gén helyére sikeresen beépült, azonban ektopikus integráció következtében további beépülések jöttek létre (4. kép).

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.



4. kép: Az *nfap* génpróbával végzett Southern blot analízis. 1. DIG-jelölt DNS marker III (Roche), 2. *Neosartorya fischeri* vad típus, 3-11. transzformánsok, 12. psk275 plazmid

A vad típusú és a $\Delta nfap$ mutáns Neosartorya fischeri növekedésének vizsgálata

A vizsgálataink során kapott eredményekből megállapítható, hogy CM táptalajon a mutáns törzs a vad típushoz képest lassabb mértékű növekedést mutat, és a közöttük kialakult különbség minimális. 24, 48 és 72 órás eredmények esetében szignifikáns eltérés is megfigyelhető. A MM táptalajon vizsgált vad és mutáns törzsek növekedése között nagyobb mértékű különbség észlelhető, mint CM táptalaj esetében. A 24, 48 és 72 órás adatok kivételével, minden esetben szignifikancia figyelhető meg a vad és mutáns törzsek között, melynek mértéke az idő elteltével növekszik, és egyre nagyobb a különbség a telepek átmérői között (2. táblázat).

| Idő | Telepátmérő (mm) | | | |
|---------|-------------------|------------------------------|------------------|-------------------|
| | Komplett táptalaj | | Minimál táptalaj | |
| | Vad típus | $\Delta nfap$ | Vad típus | $\Delta nfap$ |
| 96 óra | 43,7 \pm 0,6 | 41,7 \pm 1,5 ^{ns} | 35,7 \pm 2,1 | 32,3 \pm 1,2* |
| 120 óra | 52,0 \pm 1,0 | 50,3 \pm 0,6 ^{ns} | 44,7 \pm 1,2 | 39,7 \pm 0,6** |
| 144 óra | 64,3 \pm 0,6 | 62,3 \pm 0,6 ^{ns} | 56,0 \pm 1,0 | 42,7 \pm 0,6*** |
| 168 óra | 71,7 \pm 0,6 | 71,0 \pm 1,0 ^{ns} | 63,0 \pm 2,0 | 48,0 \pm 1,0*** |

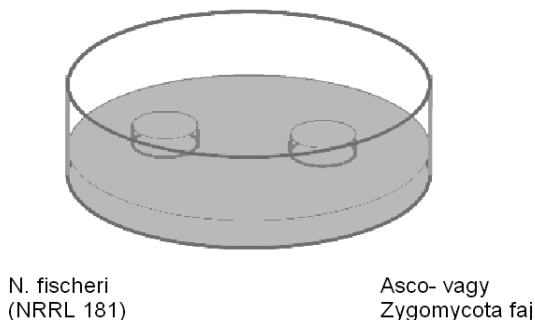
2. táblázat: A vad és a $\Delta nfap$ mutáns *Neosartorya fischeri* NRRL 181 törzsek növekedése komplett és minimál táptalajon 25 °C-on

Jelmagyarázat: ***: p<0,0001, **: p<0,005, *: p<0,05, ^{ns}: nincs szignifikáns különbség

In vitro antagonizmus tesztek minimál és komplett táptalajon

A vizsgálat során minimál- és komplett táptalajokra leoltott, vad típusú és $\Delta nfa p$ mutáns *N. fischeri* növekedését vizsgáltuk 10 járomspórás- és 11 tömlősgomba izolátummal szemben. A táptalajos Petri-csészék elkészítését követően, az 1 ml 10^5 spóra/ml szuszpenzióból kinőtt tenyészetekből dugófúróval agarkorongokat készítettünk, majd a megfelelő táptalajt tartalmazó Petri-csészékre a micéliumot hordozó résszel lefelé, a középponttól 1,5 cm távolságra elhelyeztük a *N. fischeri* izolátumokból kivágott korongokat. 24 óra elteltével a leoltott izolátumoktól 3 cm távolságra, szintén a micéliumot hordozó résszel lefelé elhelyeztük a megfelelő törzsek agarkorongjait (5. kép). Az így elkészített Petri-csészéket 25 vagy 37°C-on (*R. miehei*) inkubáltuk és 24 óránként vizsgáltuk.

Komplett táptalajon végzett teszteken megfigyelhető, hogy mind a vad, mind a deléciós mutáns hatékonyan visszaszorította az *Actinomucor elegans* (NRRL 1706), a *Backusella circina* (NRRL 3293) a *Mortierella nantahalensis* (NRRL 5842), a *Fusarium cerealis* (SZMC 11048), a *Fusarium graminearum* (SZMC 11054), a *Fusarium poae* (SZMC 11045) és a *Fusarium polyphialidicum* (SZMC 11042) növekedését. Minimál táptalaj esetében a *Rhizomucor miehei* (CBS 360.92) a *Mucor rammanianus* (WRL CN(M)304) és az *Aspergillus giganteus* (IMI 343707) törzsekkel bővült az NFAP-ra érzékeny fonalasgombák listája.



5. kép: Az *in vitro* antagonizmus vizsgálat sematikus ábrája

A vizsgálat során kapott eredmények alapján összességében elmondható, hogy:

- a vad típusú törzs szignifikánsan hatékonyabban gátolta az NFAP-érzékeny izolátumok növekedését, mint a deléciós törzs;
- ez a gátló hatás (és a két törzs *in vitro* antagonizmus képességbeli különbsége) elsősorban minimál táptalajon érvényesült;
- amennyiben a vad és *Δnfap* mutáns törzsek növekedésgátló hatást mutattak ugyanazon kompetitor gombaizolátummal szemben, a deléciós törzs *in vitro* antagonizmus értéke szignifikánsan kisebb volt.

A szakirodalomban a mai napig nem található magyarázat a fonalasgombák által termelt defenzinszerű proteinek biológiai szerepére. Feltételezéseink szerint a fonalas gombafajok számára, a velük hasonló táplálkozási és ökológiai igényekkel rendelkező organizmusokkal szembeni sikeres versenyben, az általuk termelt defenzinszerű antifungális proteinek nagymértékű előnyt nyújtanak, hiszen ezek a fehérjék a mikrobiális hatásokkal szemben, a termelő gazdák veleszületett immunitásának és az elsődleges védelmi vonalának primitív mechanizmusait jelentik.⁴³ AFP termelő *A. giganteus* izolátummal végzett *in vitro* antagonizmus kísérletek során kimutatták, hogy egy hasonló ökológiai *niche*-t elfoglaló fonalasgomba jelenléte fokozza az *afp* gén expresszióját, ezáltal a környezetben megnőtt AFP mennyisége előnyt biztosít az *A. giganteus* számára a hasonló élőhelyért folytatott küzdelemben.⁴⁴ Ebben a kísérleti rendszerben is nagymértékben befolyásolta az alkalmazott táptalaj összetétele az *A. giganteus* antagonista képességét.⁴⁵ Munkánk egyik fő célja az volt, hogy az említett feltételezéseket megvizsgáljuk az NFAP-t termelő *N. fischeri* törzsek, hasonló ökológiai *niche*-t elfoglaló mikroorganizmusokkal szembeni, tápanyagok megszerzéséért és a megfelelő élőhelyért folytatott versenyben.

Kísérleti eredményeink lényeges ismereteket szolgáltathatnak a későbbiekben a fonalasgombák által termelt defenzinszerű proteinek biológiai szerepének, illetve pontos hatásmechanizmusának megismeréséhez.

Irodalom

ARTIMO ET AL. 2012 = Artimo, P. – Jonnalagedda, M. – Arnold, K. – Baratin, D. – Csardi, G. – de Castro, E. – Duvaud, S. – Flegel, V. – Fortier, A. – Gasteiger, E. – Grosdidier, A. – Hernandez, C. – Ioannidis, V. – Kuznetsov, D. – Liechti, R. – Moretti, S. – Mostaguir, K. – Redaschi, N. – Rossier, G. – Xenarios, I. – Stockinger, H.: ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research* 40(W1) (2012) 597–603.

⁴³ HEGEDÜS – MARX 2013, 132–145.

⁴⁴ MEYER – STAHL 2003, 68–74.

⁴⁵ MEYER – STAHL 2003, 68–74.

- BATTA ET AL. 2009 = Batta, Gy. – Barna, T. – Gáspári, Z. – Sándor, Sz. – Kövér, K.E. – Binder, U. – Sarg, B. – Kaiserer, L. – Chhillar, A. K. – Eigentler, A. – Leiter, E. – Hegedüs, N. – Pócsi, I. – Lindner, H. – Marx, F.: Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF-a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. *FEBS Journal* 276 (2009) 2875–2890.
- BINDER ET AL. 2010a = Binder, U. – Chu, M. – Read, N. D. – Marx, F.: The antifungal activity of the *Penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 9 (2010) 1374–1382.
- BINDER ET AL. 2010b = Binder, U. – Oberparleiter, C. – Meyer, V. – Marx, F.: The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 75 (2010) 294–307.
- BINDER ET AL. 2011 = Binder, U. – Bencina, M. – Eigentler, A. – Meyer, V. – Marx, F.: The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFP_{NN5353} activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. *BMC Microbiology* 11 (2011) 209.
- CAMPOS-OLIVAS ET AL. 1995 = Campos-Olivas, R. – Bruix, M. – Santoro, J. – Lacadena, J. – Martinez del Pozo, A. – Gavilanes, J. G. – Rico, M.: NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry* 34 (1995) 3009–3021.
- CERONI ET AL. 2006 = Ceroni, A. – Passerini, A. – Vullo, A. – Frasconi, P.: DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Research* 34 (2006) 177–181.
- CHENG ET AL. 2005 = Cheng, J. – Randall, A. Z. – Sweredoski, M. J. – Baldi, P.: SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Research* 33 (2005) 72–76.
- GALGÓCZY – KOVÁCS – VÁGVÖLGYI 2010 = Galgóczy, L. – Kovács, L. – Vágvölgyi, Cs.: Defensin-like antifungal proteins secreted by filamentous fungi. In: Méndez-Vilas, A. (szerk.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Vol. 1. [Microbiology Book Series-Number 2.] Badajoz: Formatex Research Center, 2010, 550–559.

- GALGÓCZY ET AL. 2013a = Galgóczy, L. – Kovács, L. – Karácsony, Z. – Virágh, M. – Hamari, Zs. – Vágvolgyi, Cs.: Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 159 (2013) 411–419.
- GALGÓCZY ET AL. 2013b = Galgóczy, L. – Virágh, M. – Kovács, L. – Tóth, B. – Papp, T. – Vágvolgyi, Cs.: Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among *Fusaria*. *Peptides* 39 (2013) 131–137.
- GEISEN 2000 = Geisen, R.: *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to the paf gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. *International Journal of Food Microbiology* 62 (2000) 95–101.
- HAGEN ET AL. 2007 = Hagen, S. – Marx, F. – Ram, A. F. – Meyer, V.: The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2007) 2128–2134.
- HEGEDŰS – MARX 2013 = Hegedűs, N. – Marx, F.: Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews* 26(4) (2013) 132–145.
- HEGEDŰS ET AL. 2011 = Hegedűs, N. – Sigl, C. – Zadra, I. – Pócsi, I. – Marx, F.: The paf gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Basic Microbiology* 51 (2011) 253–262.
- KAISERER ET AL. 2003 = Kaiserer, L. – Oberparleiter, C. – Weiler-Görz, R. – Burgstaller, W. – Leiter, É. – Marx, F.: Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Archives of Microbiology* 180 (2003) 204–210.
- KOVÁCS ET AL. 2011a = Kovács, L. – Virágh, M. – Takó, M. – Papp, T. – Vágvolgyi, Cs. – Galgóczy, L.: Antifungal activity of the *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) against filamentous fungal isolates from clinical sources. *Clinical Microbiology and Infection* 17 (S4) (2011) 327.
- KOVÁCS ET AL. 2011b = Kovács, L. – Virágh, M. – Takó, M. – Papp, T. – Vágvolgyi, Cs. – Galgóczy, L.: Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). *Peptides* 32 (2011) 1724–1731.
- LACADENA ET AL. 1995 = Lacadena, J. – Martínez del Pozo, A. – Gasset, M. – Patiño, B. – Campos-Olivas, R. – Vázquez, C. – Martínez-Ruiz, A. – Mancheño, J. M. – Oñaderra, M. – Gavilanes, J. G.: Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 324 (1995) 273–281.

- LASKOWSKI ET AL. 1993 = Laskowski, R. A. – MacArthur, M. W. – Moss, D. S. – Thornton, J. M.: PROCHECK – a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26 (1993) 283–291.
- LASKOWSKI ET AL. 1996 = Laskowski, R. A. – Rullmannn, J. A. – MacArthur, M. W. – Kaptein, R. – Thornton, J. M.: AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR* 8 (1996) 477–486.
- LEE ET AL. 1999 = Lee, G.D. – Shin, S. Y. – Maeng, C. Y. – Jin, Z. Z. – Kim, K. L. – Hahm, K. S.: Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 63 (1999) 646–651.
- LEITER ET AL. 2005 = Leiter, E. – Szappanos, H. – Oberparleiter, C. – Kaiserer, L. – Csernoch, L. – Pusztahelyi, T. – Emri, T. – Pócsi, I. – Salvenmoser, W. – Marx, F.: Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (2005) 2445–2453.
- MARTINEZ-RUIZ ET AL. 1997 = Martinez-Ruiz, A. – del Pozo, M. – Lacadena, J. – Mancheni, J. M. – Onaderra, M. – Gavilanes, J. G.: Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1240 (1997) 81–87.
- MARX 2004 = Marx, F.: Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65 (2004) 133–142.
- MARX ET AL. 1995 = Marx, F. – Haas, H. – Reindl, M. – Stoffler, G. – Lottspeich, F. – Redl, B.: Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* 167 (1995) 167–171.
- MARX ET AL. 2005 = Marx, F. – Salvenmoser, W. – Kaiserer, L. – Graessle, S. – Weiler-Gröz, R. – Zadra, I. – Oberpairleiter, C.: Proper folding of the antifungal protein PAF is required for optimal activity. *Research in Microbiology* 156 (2005) 35–46.
- MARX ET AL. 2008 = Marx, F. – Binder, U. – Leiter, É. – Pócsi, I.: The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (2008) 445–454.

- MEYER – STAHL 2003 = Meyer, V. – Stahl, U.: The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *Journal of Basic Microbiology* 43 (2003) 68–74.
- MEYER 2008 = Meyer, V.: A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (2008) 17–28.
- OBERPARLEITER ET AL. 2003 = Oberparleiter, C. – Kaiserer, L. – Haas, H. – Ladurner, P. – Andratsch, M. – Marx, F.: Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive aspergilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (2003) 3598–3601.
- PALICZ ET AL. 2013 = Palicz, Z. – Jenes, Á. – Gáll, T. – Miszti-Blasius, K. – Kollár, S. – Kovács, I. – Emri, M. – Márián, T. – Leiter, É. – Pócsi, I. – Csősz, É. – Kalló, G. – Hegedűs, Cs. – Virág, L. – Csernoch, L. – Szentesi, P.: In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicology and Applied Pharmacology* 269 (2013) 8–16.
- PETTERSEN ET AL. 2004 = Pettersen, E. F. – Goddard, T. D. – Huang, C. C. – Couch, G. S. – Greenblatt, D. M. – Meng, E. C. – Ferrin, T. E.: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25 (2004) 1605–1612.
- RODRÍGUEZ-MARTÍN ET AL. 2010 = Rodríguez-Martín, A. – Acosta, R. – Liddell, S. – Núñez, F. – Benito, M. J. – Asensio, M. A.: Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides* 31 (2010) 541–547.
- SALI ET AL. 1995 = Sali, A. – Potterton, L. – Yuan, F. – van Vlijmen, H. – Karplus, M.: Evaluation of comparative protein modelling by MODELLER. *Proteins* 23 (1995) 318–326.
- SKOURI-GARGOURI – GARGOURI 2008 = Skouri-Gargouri, H. – Gargouri, A.: First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Peptides* 11 (2008) 1871–1877.
- THEIS ET AL. 2003 = Theis, T. – Wedde, M. – Meyer, V. – Stahl, U.: The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (2003) 588–593.
- THEIS ET AL. 2005 = Theis, T. – Marx, F. – Salvenmoser, W. – Stahl, U. – Meyer, V.: New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. *Research in Microbiology* 156 (2005) 47–56.

- VILA ET AL. 2001 = Vila, L. – Lacadena, V. – Fontanet, P. – Martínez del Pozo, A. – San Segundo, B.: A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 (2001) 1327–1331.
- WNENDT – ULBRICH – STAHL 1994 = Wnendt, S. – Ulbrich, N. – Stahl, U.: Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal protein from *Aspergillus giganteus*. *Current Genetics* 25 (1994) 519–523.

Internetes források

PROTEIN CALCULATOR v3.3, THE SCRIPPS KUTATÓINTÉZET
<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html> (2014.04.13. 17:18).

Investigation of the biological role of *Neosartorya fischeri* antifungal protein

LILIÁNA TÓTH¹ – LAURA KOVÁCS¹ – CSABA VÁGVÖLGYI¹ –
FLORENTINE MARX² – LÁSZLÓ GALGÓCZY¹

¹University of Szeged, Department of Microbiology, Faculty of Science and Informatics

²Innsbruck Medical University, Biocenter, Division of Molecular Biology

Cysteine-rich antifungal proteins secreted by filamentous Ascomycetes have great potential for medical and agricultural applications where antibiotic resistance of (opportunistic) fungal pathogens poses significant problems. In spite of that they are intensively studied nowadays; there is no information in the literature about their exact biological function. We suppose that they also play a role in the emulsion for nutrients and habitat against microorganisms with similar ecological niche. In our previous work we demonstrated that the *Neosartorya fischeri* NRRL 181 secretes a novel representative of this protein group, termed the *N. fischeri* antifungal protein (NFAP). Our goal was the investigation of its biological role in the competition for habitat against potential competitor fungal isolates.

In our work we created the *nfap*-deletion mutant strain of the *N. fischeri* NRRL 181, and we analysed its growth in minimal and complete medium compared to the wild-type. We also examined the *in vitro* antagonism ability (via calculation of *in vitro* antagonism index, IVAI) of the wild type and the $\Delta nfap$ mutant strains against possible competitor fungal isolates belonging to Zygo- and Ascomycetes.

We observed that $\Delta nfap$ strain shows slower growth than the wild-type in minimal medium. Compared to the $\Delta nfap$ strain, the wild-type effectively inhibited the growth of NFAP-sensitive fungal isolates. This difference in the *in vitro* antagonism ability is prevailed strongly in minimal medium. If both types of *N. fischeri* showed inhibition effect against the competitor fungal isolate, IVAI of $\Delta nfap$ strain was lower.

Based on our results NFAP plays a role in the emulsion for nutrients and habitat against fungi with similar ecological niche and in the fungal growth in the presence of nutrient limitation.

The research of T.L. and G.L. was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program'.